

类风湿性关节炎治疗药物研究进展

张晓攀, 李艳贞*, 李珊珊, 罗俊永

国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100022

摘要: 类风湿性关节炎(RA)是一种常见的慢性全身性自身免疫性疾病,其病情错综复杂,发病机制尚未完全明确,目前普遍认为个体遗传易感性、环境因素和失调的免疫反应与RA发病有关。主要就RA的发并机制及其治疗药物研发进展进行综述。

关键词: 类风湿性关节炎; 非甾体抗炎药; 改善风湿病情的药物; 糖皮质激素; 生物制剂; 靶向小分子药物

中图分类号: R976 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)10-1906-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.031

An overview of rheumatoid arthritis therapeutic drugs

ZHANG Xiaopan, LI Yanzhen, LI Shanshan, LUO Junyong

Center for Drug Evaluation, China Food and Drug Administration, Beijing 100022, China

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is a common chronic systemic autoimmune disease with complicated condition. The mechanism of RA is unclear, which is generally regarded as to be related to genetic factors, environmental factors and disorders of immune reactions. In this article, we briefly review the pathogenesis of RA and the RA therapeutic drugs.

Key words: Rheumatoid arthritis; NSAIDs; DMARDs; glucocorticoids; biologics; targeted small molecule drugs

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的慢性全身性自身免疫性疾病,其临床表现主要为慢性、对称性、周围性多关节炎性病损,并随疾病的进展,可累及心、肺、肾、眼等多个器官^[1]。其主要病理特征是滑膜炎、滑膜增生、血管炎、血管翳形成以及类风湿结节的形成继而导致软骨和骨的破坏、关节畸形等。如果不经过正规治疗,约75%的患者会在3年内出现残疾^[2]。

RA分布于世界各地,在不同人群中的患病率为0.18%~1.07%,其发病具有一定的种族差异,印地安人高于白种人,白种人高于亚洲黄种人^[3]。在我国,RA总患病人数逾500万。RA在各年龄中皆可发病,高峰年龄多在30~50岁,通常女性发病多于男性,女性与男性患本病的比例约为(2~3):1^[4]。本文主要就RA的发病机制和AR治疗药物研究进展进行综述。

1 RA发病机制

由于RA病情错综复杂,其发病机制尚未完全

明确,目前普遍认为RA的发病与个体遗传易感性、环境因素和失调的免疫反应有关。RA的病理机制具有自身免疫性疾病的共同特点,即由多种免疫细胞和各自的炎症因子介导。另外,一些研究表明滑膜细胞的过度增生、滑膜衬里层的增厚、滑膜间质浸润大量的炎症细胞、大量炎症因子的分泌、微血管新生、血管翳形成、大量破骨细胞和滑膜细胞侵蚀软骨和骨,也是导致RA患者关节畸形的根本原因^[5]。滑膜增生的程度与软骨侵蚀的程度息息相关^[6]。

2 RA治疗药物

RA治疗的目标主要是缓解疼痛,减缓疾病进展,阻止骨和关节的损坏,提高患者生活质量。但RA病情错综复杂,其发病机制尚未完全明确,因而临床上还缺乏特异性治疗措施。目前,RA治疗药物主要由非甾体抗炎药(NSAIDs)、改善风湿病情的药物(DMARDs)、糖皮质激素(GCs)、生物制剂以及靶向小分子药物5大类组成^[7]。

收稿日期: 2018-04-11

第一作者: 张晓攀,男,博士,高级工程师,主要从事化药药学审评工作。Tel: (010)85242670 E-mail: zhangxp@cde.org.cn

*通信作者: 李艳贞,女,助理研究员,硕士,主要从事制剂研发,化学药品审评。Tel: (010)85242606 E-mail: liyzh@cde.org.cn

2.1 非甾体抗炎药(NASIDs)

非甾体抗炎药主要是通过抑制环氧化酶(COX)的活性,减少花生四烯酸转化成前列腺素等炎症介质,从而减轻和控制由于炎症反应引起的症状,发挥有效的抗炎作用^[8]。但非甾体抗炎药不能控制疾病病情,仅能减轻RA患者的临床症状,消除关节局部的炎症反应。

非甾体抗炎药种类繁多,FDA将非甾体抗炎药分为3类:(1)乙酰水杨酸盐类,包括阿司匹林;(2)非乙酰基水杨酸盐类,包括水杨酸镁、水杨酸钠、水杨酸胆碱镁、二氟尼柳(二氟苯水杨酸)、双水杨酸酯等;(3)非水杨酸盐类,包括双氯芬酸、醋氯酚酸、吲哚美辛、布洛芬、氟比洛芬、萘普生、萘丁美酮、保泰松、双氯灭痛、芬洛芬、酮基布洛芬、酮咯酸、四氯芬那酸、舒林酸、托美丁、氯诺昔康、美洛昔康、吡罗昔康、塞来昔布、帕瑞昔布、依托考昔等。

该类药物的主要严重不良反应为心血管风险,这主要是由于当COX-2受到抑制时,前列环素(PGI₂)的心脏保护功能也被削弱,从而引起心血管不良反应。近年来,以COX为靶点的在研RA药物已很少涉及,甚至已上市药物如罗非昔布等因严重的心血管风险而召回。COX-2抑制剂的心血管风险已经严重影响了该类药物在市场上的使用,药物使用时需考虑风险获益比。

2.2 改善风湿病情的药物(DMARDs)

临床上将具有阻止风湿病情发展的一类药称为改善风湿病情的药物(DMARDs),DMARDs是目前治疗RA的主要药物^[9],虽然各类药物作用机制各异,对关节疼痛、肿胀无直接的治疗作用,但都能够延缓疾病进展,阻止骨的损坏,对临床客观指标、C反应蛋白、类风湿因子等的改善有作用。美国风湿协会制定的用药指南和中华风湿学会类风湿性关节炎治疗指南中都提出早期积极治疗,合理使用DMARDs,是治疗类风湿性关节炎的关键。

这类制剂包括三大类:(1)传统的DMARDs,如金制剂、D-青霉胺、柳氮磺吡啶(SSZ)及抗疟药等;(2)免疫抑制剂,如甲氨蝶呤(MTX)、来氟米特、环磷酰胺、硫唑嘌呤、环孢素等;(3)生物类DMARDs,如靶向IL-1、IL-6和TNF- α 的单克隆抗体等。

2.3 糖皮质激素(GC)

GC是强效的抗炎抗过敏药。类风湿关节炎患者在炎症急性发作期,可服用短效的激素,其剂量根据病情的严重程度进行调整。GC可迅速明显地

缓解患者的炎症症状,改善关节的功能,但不能根治RA,停药后症状会复发^[18]。患者长期使用GC,可能会造成依赖性导致停药困难,还会出现许多不良反应,如高血压、高血脂、骨质疏松,皮肤萎缩等。GC的不良反应与其用量成正相关关系^[19]。

临床上常用的糖皮质激素类药物有:泼尼松、甲泼尼龙、倍他米松、丙酸倍氯米松、泼尼松龙、氢化可的松、地塞米松等。

2.4 生物制剂

生物制剂是近年来在临床中使用量不断攀升的一类药物,主要为单克隆抗体或细胞受体拮抗剂等,通过特异性地针对细胞膜上或者细胞外的某些分子来发挥作用,能够有效地减轻患者关节部位的肿痛以及晨间的僵硬,抑制促炎因子的分泌,降低了RA患者血液的发炎指数^[20]。这一类药具有药效快,药力强的优点,但是由于生物制剂大部分属于蛋白质产品,易降解需要反复注射,且研发费用高昂,贮藏运输条件苛刻,使得生物制剂价格昂贵。

目前已经上市的生物制剂主要有:①TNF- α 抑制剂^[21] 英夫利昔单抗(infliximab)、依那西普(etanercept)、阿达木单抗(adalimumab)和戈利木单抗(golimimumab);②阿贝西普(abatacept),是由百时美施贵宝公司研发的由细胞毒T细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4,CTLA4)的细胞外结构域与免疫球蛋白IgG1的Fc区组成的融合蛋白,是第一个应用于临床的CTLA4-Ig药物,通过释放抑制性信号和拮抗CD28与B7的结合抑制T细胞的增殖,使得在RA发病中占有重要地位的T细胞数目减少,同时还可抑制TNF- α 、干扰素 γ (INF- γ)和白介素-2(IL-2)的产生^[22];③利妥昔单抗(rituximab),是由罗氏公司开发的一种人鼠嵌合性单克隆抗体,能特异性地与跨膜抗原CD20结合,启动介导B细胞溶解的免疫反应^[23]。④托珠单抗(tocilizumab),是由罗氏公司开发的首个人源化IL-6受体单克隆抗体,可阻断IL-6生物学活性,抑制炎症反应,明显缓解RA的临床症状,有效防止关节破坏^[24]。

2.5 靶向小分子药物

蛋白激酶(PK)催化腺苷三磷酸上的 γ -磷酸转移到底物的氨基酸残基上,激活底物,从而调节生物体内的信号转导。随着人们对激酶信号通道及疾病病理的进一步认识,通过设计小分子激酶抑制剂,抑制激酶的活性,从而使其介导的下游反应减弱或者中止,减缓或者停止疾病的进程^[25]。

Janus 激酶(JAK)是存在于细胞内的非受体酪氨酸蛋白激酶^[26-28],其家族主要包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 Tyk2,其中,JAK1、JAK2 以及 Tyk2 广泛表达于各种组织细胞中,而 JAK3 则主要在造血细胞中表达^[29-30],它们在炎症因子细胞内信号传导中扮演着不可缺少的角色。JAK-STAT 信号通道在包括造血细胞在内多种类型细胞的分化、增殖和存活中起重要作用。JAK-STAT 信号通道已成为抗 RA 药物设计的重要靶标,目前已经上市的治疗 RA 的靶向 JAK 的小分子药物主要有托法替布(Tofacitinib Citrate,商品名为 Xeljanz,美国辉瑞公司)和巴瑞替尼(Baricitinib,商品名为 Olumiant,礼来和因赛特公司)。但托法替布和巴瑞替尼对 JAK 亚型的选择性作用较差,会引发感染、血脂异常等副作用,开发有一定特异性的抑制剂是目前 JAK 抑制剂开发过程中遇到的最大挑战,也是目前制药企业努力实现的目标。

据 IMS Health 统计,2015 年 Tofacitinib 用于 RA 治疗的全球销售为 5.48 亿美元,在销售排行榜中排名第 8 位,是仅有的小分子药物。该靶点正成为目前研发的热点之一,据 Thomson Reuters Integrity 数据库统计以胞内 Jak 激酶及其他激酶为靶点的在研 RA 药物有 22 个,如 Galapagos 公司与 Gilead 公司合作开发的 filgotinib(高选择性 JAK1 抑制剂);雅培开发的 ABT-494(JAK 抑制剂);Vertex 制药开发的 decernotinib(选择性 JAK3 抑制剂)等。

3 国内外销售及研发状况对比分析

在过去的 10 多年里,生物单抗药物的问世成为 RA 治疗史上的里程碑。由于在疗效和耐受性方面均优于传统 RA 药物,RA 生物药物一度成为药物市场上的“重磅炸弹”,尤其是靶向 TNF- α 抑制剂。据 IMS Health 统计,2015 年全球用于治疗 RA 的药物支出达 214 亿美元,而排在销售额前位的除托法替布外其余均是生物制剂(表 1)。从 2013—2015 年 RA 药物的全球市场形势可以看出,生物药占据了 RA 销售总额的 85.7%,其中恩利、修美乐等连续几年位居榜首,可谓占据了 RA 销售总额的半壁江山。

随着生物类似药指导原则的细化,监管体系的完善,生物类似药在欧美的上市节奏明显加快,2017 年欧洲批准 6 个 RA 生物类似药上市,FDA 批准 2 个 RA 生物类似药上市(表 2)。

我国对于类风湿性关节炎学科研究起步较晚,但是发展较快,国内的 RA 药物市场规模从 2013—

2016 年保持着稳步扩大的趋势,2015 年的销售额达到 574 亿元,年复合增长率 6.9%。国内已上市的 RA 生物原研药包括 Enbrel(恩利)、Humira(修美乐)、Remicade(类克)、Actemra(雅美罗),2017 年 12 月杨森公司的 Simponi(欣普尼)获批,2018 年 2 月辉瑞公司的靶向小分子药物 Xeljanz(尚洁)获批。对比国内临床使用的 RA 类药物种类,基本上已逐渐与国外接轨。

根据米内网数据显示,2016 年国内重点城市公立医院骨关节 TOP10 药物占据其总体市场的 78.26%。具体品种是氟比洛芬酯、氨基葡萄糖、鹿瓜多肽、重组人 II 型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白、帕瑞昔布、骨肽、羟氯喹、骨瓜提取物、玻璃酸钠和塞来昔布。从上述品种可以看出,国外畅销的抗体类药物尚未进入国内市场视野。用于类风湿性关节炎的国产 RA 生物药仅有 TNF- α 拮抗剂(注射用重组人 II 型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白)。从国内外销售额对比治疗方式的差异,国外以生物药、靶向小分子为主流,国内仍以植物药、化药为主,生物药及靶向小分子药物尚处于起步阶段。

但随着专利到期影响,我国 RA 生物药及靶向小分子药物的研发逐渐展露头角,根据 insight 数据库及药智数据库不完全统计:1)目前国内进入到 IND 阶段以上的阿达木单抗类似药开发的公司达到了 18 家以上,处于临床前研究的公司估计可能达到 10 家左右。2)国内对依那西普的研发较早,三生国健早在 2005 年上市,上海赛金的强克(2012 年获批)和海正药业的安百诺(2015 年获批)两个同类药也已经相继上市。目前,处于申报临床阶段的公司有 5 家以上。3)利妥昔单抗申报临床数量在 5 家以上,其中复宏汉霖成为国内开发利妥昔单抗类似物的企业中最先报产的一个,有望成为美罗华的首仿药。4)荣昌生物制药(烟台)有限公司研发的注射用重组人 B 淋巴细胞刺激因子受体-抗体融合蛋白,是一种高效阻断 B 淋巴细胞刺激因子的新型重组蛋白,主要用于治疗类风湿关节炎等免疫系统疾病,属国内外未上市新治疗用生物制品,按照生物制品注册分类 1 申报临床,目前已完成 II 期临床试验。5)靶向小分子药物托法替布仿制药申报数量将近 20 家,其中 4 家处于申报生产阶段。6)值得一提的是,国内先声药业发现了第一个 NF κ B 小分子抑制剂艾拉莫德(Iguratimod),在 RA 领域治疗潜力也不容忽视。

在我国进口 RA 生物药、小分子靶向药物高昂

表1 RA治疗药物全球市场销售额排行(2013—2015)

Table 1 Global ranking of drug sales in the treatment of RA(2013-2015)

商品名	上市时间	通用名	原研公司	靶点	销售情况	
					销售 额/百 万美 元	占 比/%
Enbrel(恩利)	1998	Etanercept(依那西普)	Amgen/Pfizer	TNF- α 抑制剂	14 049	25.42
Humira(修美乐)	2003	Adalimumab(阿达木单抗)	Abbvie	TNF抑制剂	12 310	22.27
Remicade(类克)	1998	Infliximab(英夫利西单抗)	Johnson & Johnson	TNF抑制剂	7634	13.81
Orencia	2006	Abatacept(阿贝西普)	BMS	CTLA4药物	4 332	7.84
Actemra(雅美罗)	2013	Tocilizumab(托珠单抗)	Roche	IL-6	2 969	5.37
Simponi(欣普尼)	2009	Golimumab(戈利木单抗)	Johnson & Johnson	TNF- α 抑制剂	2 469	4.47
Cimzia	2009	Certolizumab Pegol(塞妥珠单抗)	Ucb	TNF- α 抑制剂	1 985	3.59
Xeljanz(尚洁)	2012	Tofacitinib(托法替布)	Pfizer	JAK1 JAK3抑制剂	970	1.76
Mabthera(美罗华)	2006	Rituximab(利妥昔单抗)	Roche	B细胞CD20抗原	1 629	2.95
其他药物		其他药物			6 920	12.52
总销售额					55 268	

表2 2017年欧盟和美国批准上市的RA生物类似药

Table 2 Biosimilar drug for RA approved by EMA and FDA in 2017

	药物	公司	备注
欧盟	Truxima (Rituxanbiosimilar)	Celltrion	利妥昔单抗类似药
	Amjevita (Humirabiosimilar)	Amgen	阿达木类似药
	Erelzi (Enbrel biosimilar)	Sandoz	依那西普类似药
	Rixathon (Rituxanbiosimilar)	Sandoz	利妥昔单抗类似药
	Imradli (Humirabiosimilar)	Biogen	阿达木类似药
FDA	Cyltezo (Humirabiosimilar)	BoehringerIngelheim	阿达木类似药
	Renflexis (Remicadebiosimilar)	Samsung Bioepis	英夫利昔单抗仿制药
	Cyltezo (Humirabiosimilar)	BoehringerIngelheim	阿达木类似药

的价格限制了其临床使用,但随着仿制药的陆续上市,这将极大改善RA药物的可及性,为类风湿关节炎等自身免疫疾病患者增加治疗选择和提高生活质量。

4 总结与展望

15年前,RA的治疗目标是主要是解决由控制不佳导致的疾病恶化和由长期使用皮质类固醇产生的药物副作用。而近年来,生物制品以及小分子靶向药物的问世使类风湿关节炎的治疗发生了革命性变化,为类风湿关节炎等自身免疫疾病患者增加治疗选择和提高生活质量。可以预见的是,随着科学技术的不断发展、研发人员的不懈努力以及RA病因的不断揭示,药物科学家们会开发出更加安全、有效的RA药物。

参考文献

- [1] Derksen V F A M, Huizinga T W J, Van Der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis [J]. Semin Immunopathol, 2017, 39 (4): 437-446.
- [2] Gao Q, Wang Y X, Xu D, et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies [J]. Bone Res, 2018(6): 15.
- [3] Alamanos Y, Drosos A A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis [J]. Autoimmun Rev, 2005, 4(3): 130-136.
- [4] 王心蕊, 代宇驰. 类风湿关节炎诊断与治疗进展追踪 [J]. 健康导报: 医学版, 2015, 20 (1): 28-30
- [5] Bottini N, Firestein G S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(1): 24-33.
- [6] Mor A, Abramson S B, Pillinger M H. The fibroblast-like

- synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction [J]. *Clin Immunol*, 2005, 115(2): 118-128.
- [7] Gaffo A, Saag KG, Curtis J R. Treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2006, 63(24): 2451-2465.
- [8] Singh G, Ramry D R, Morfeld D, et al. Gastrointestinal tract complications of NASID treatment in rheumatoid arthritis. A prospective observational cohort study [J]. *Arch Intern Med*, 1996, 156(14): 1530-1536.
- [9] Ichikawa N, Yamanaka H. Disease-modifying antirheumatic drugs [J]. *Clin Calcium*, 2012, 22(2): 215-221.
- [10] Ling S, Bluett J, Barton A. Prediction of response to methotrexate in rheumatoid arthritis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2018, 14(5): 419-429.
- [11] 陈楠, 王振刚. 类风湿关节炎治疗的核心药物——甲氨蝶呤 [J]. *中国医刊*, 2013, 48(7): 3-5.
- [12] Fox R I, Herrmann M L, Frangou C G, et al. Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Immunol*, 1999, 93(3): 198-208.
- [13] 劳志英, 倪立青, 张之澧, 等. 来氟米特治疗类风湿关节炎双盲试验 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2001, 20(2): 94-97.
- [14] Plosker G L, Croom K F. Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis [J]. *Drugs*, 2005, 65(13): 1825-1849.
- [15] Walker-Bone K, Farrow S. Rheumatoid arthritis [J]. *BMJ Clin Evid*, 2007, 08: 1124-1169.
- [16] 梁柳琴, 杨岫岩. 抗疟药在风湿免疫病的应用 [J]. *新医学*, 2001, 32(1): 51-52.
- [17] Miller R C, Petereit D G, Sloan J A, et al. N08C9 (Alliance): a phase 3 randomized study of sulfasalazine versus placebo in the prevention of acute diarrhea in patients receiving pelvic radiation therapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2016, 95(4): 1168-1174.
- [18] Kirwan J R, Bijlsma J W, Boers M, et al. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(1): CD006356.
- [19] Ethgen O, De Lemos Esteves F, Bruyere O, et al. What do we know about the safety of corticosteroids in rheumatoid arthritis? [J]. *Curr Med Res Opin*, 2013, 29(9): 1147-60.
- [20] Woodrick R S, Ruderman E M. Safety of biologic therapy in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(11): 639-52.
- [21] 吴华勋, 魏伟. 改善病情抗风湿药和生物制剂治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. *临床合理用药*, 2014, 7(2): 176-177.
- [22] Bonelli M, Scheinecker C. How does abatacept really work in rheumatoid arthritis? [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30(3): 295-300.
- [23] Cohen M D, Keystone E. Rituximab for rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Ther*, 2015, 2(2): 99-111.
- [24] 王立, 陈华, 郑文洁. 白细胞介素-6阻滞剂在自身免疫病治疗中的应用进展 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2013, 10: 699-702.
- [25] Chakravarty S D, Poulidakos P I, Ivashkiv L B, et al. Kinase inhibitors: a new tool for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Immunol*, 2013, 148(1): 66-78.
- [26] Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T, et al. Tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes [J]. *Oncogene*, 1990, 5(9): 1329-1336.
- [27] Wilks A F. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(5): 1603-1607.
- [28] Harpur A G, Andres A C, Ziemiecki A, et al. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases [J]. *Oncogene*, 1992, 7(7): 1347-1353.
- [29] Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, et al. The Janus kinases (Jaks) [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(12): 253.
- [30] Rane S G, Reddy E P. JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells [J]. *Oncogene*, 1994, 9(8): 2415-2423.
- [31] 王铁英, 胡春. 托法替尼柠檬酸盐(Tofacitinib) [J]. *中国药物化学杂志*, 2013, 23(2): 166-167.
- [32] Machado M A, Moura C S, Guerra S F, et al. Effectiveness and safety of tofacitinib in rheumatoid arthritis: a cohort study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20: 60.
- [33] Markham A. Baricitinib: first global approval [J]. *Drugs*, 2017, 77(2): 697-704.
- [34] Shi J G, Chen X J, Lee F, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of baricitinib, an oral JAK 1/2 inhibitor, in healthy volunteers [J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54(12): 1354-1361.
- [35] Ai-Salama Z T, Scott L J. Baricitinib: a review in rheumatoid arthritis [J]. *Drugs*, 2018, <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0908-4>. [Epub ahead of print].